

**PCT**  
**NOTIFICATION OF ELECTION**  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 09 April 2001 (09.04.01)	<b>Applicant's or agent's file reference</b> PCT1200-031
<b>International application No.</b> PCT/EP00/06539	<b>Priority date (day/month/year)</b> 08 July 1999 (08.07.99)
<b>International filing date (day/month/year)</b> 10 July 2000 (10.07.00)	
<b>Applicant</b> FEUSSNER, Ivo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
08 February 2001 (08.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b> Nestor Santesso Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--



①9 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenl gungsschrift**  
⑩ **DE 199 31 819 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 199 31 819.0  
㉔ Anmeldetag: 8. 7. 1999  
㉕ Offenlegungstag: 8. 3. 2001

㉙ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/02**  
C 12 N 15/53  
C 12 N 15/82  
C 12 N 5/10  
A 01 H 5/00  
C 12 P 7/64

**DE 199 31 819 A 1**

- ㉚ Anmelder:  
Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), 06120 Halle,  
DE
- ㉜ Vertreter:  
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,  
80538 München
- ㉞ Erfinder:  
Feussner, Ivo, Dr., 06114 Halle, DE; Hornung, Ellen,  
Dr., 06484 Quedlinburg, DE; Rosahl, Sabine, Dr.,  
06120 Halle, DE

- ㉟ Entgegenhaltungen:
- Hawkins, Dan J. und Brash, Alan R.: Mechanism of biosynthesis of 11R- and 12R- hydroxyeicosatetraenoic acids by eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. FEBS Letters, 1989, Vol. 247, No. 1, S. 9-12;
- Hawkins, Dan J. und Brash, Alan R.: Eggs of the Sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, Contain a Prominent (11R) and (12R) Lipoxygenase Activity. In Biol. Chem. 1987, Vol. 262, No. 16, S. 7629-7634;
- Mulliez, E., Leblanc, J.-P. [u.a.], 5-Lipoxygenase from potato tubers. Improved purification and physicochemical characteristics. In Biochem. Biophys. Acta 1987, Vol. 916, No.1, S. 13-23;
- Hornung, E. [u.a.], Conversion of cucumber lipoate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, Vol. 96, S. 4192-4197;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉙ 11-Arachidonat-Lipoxygenase-Mutante

㉙ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen einer pflanzlichen Lipoxygenase mit veränderter Positionsspezifität gegenüber Arachidonsäure und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Arachidonsäure. Insbesondere erlaubt die erfindungsgemäße LOX erstmalig das Herstellen von (11S, 14Z, 12E, 8Z, 5Z)-11-Hydroperoxy-14,12,8,5-eicosatetraensäure in großem Maßstab. Hierzu wird Arachidonsäure als Substrat mit den erfindungsgemäßen LOX unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Die Hydroperoxylierung der Arachidonsäure erfolgt dann, vorzugsweise an Position 11 mit Nebenprodukten, die an Position 8 bzw. Position 5 bzw. Position 11 und 8 und 5 hydroperoxyliert sind.

**DE 199 31 819 A 1**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No <b>PCT/EP 00/06539</b>		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12P7/64 C07C69/732 C07C59/42 C07C409/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P C07C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MULLIEZ E ET AL: "5 LIPOXYGENASE FROM POTATO TUBERS IMPROVED PURIFICATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 916, no. 1, 1987, pages 13-23, XP000990244 ISSN: 0006-3002 the whole document <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">--- -/--</div>	6,11-13
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&amp;* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">15 March 2001</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">29/03/2001</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold; margin-top: 10px;">Maddox, A</div>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06539

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>REDDY G RAMAKRISHNA ET AL:            "11-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid is the major dioxygenation production of lipoxygenase isolated from hairy root cultures of Solanum tuberosum."            BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,            vol. 189, no. 3, 1992, pages 1349-1352,            XP002162902            ISSN: 0006-291X            the whole document</p>	6,11-13
X	<p>REDDY C C ET AL: "MECHANISM OF FORMATION OF LEUKOTRIENES AND LIPOXINS FROM ARACHIDONIC ACID CATALYZED BY HOMOGENOUS LIPOXYGENASE FROM POTATO TUBERS" ADVANCES IN PROSTAGLANDIN THROMBOXANE AND LEUKOTRIENE RESEARCH,            1989, pages 132-136, XP000990260            ISSN: 0732-8141            the whole document</p>	6,11-13
X	<p>VAN ZADELHOFF GUUS ET AL: "With anandamide as substrate plant 5-lipoxygenases behave like 11-lipoxygenases."            BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,            vol. 248, no. 1, 9 July 1998 (1998-07-09), pages 33-38, XP002162903            ISSN: 0006-291X            the whole document</p>	6,11-13
X	<p>DI MARZO VINCENZO ET AL: "Biosynthesis, structure and biological activity of hydroxyeicosatetraenoic acids in Hydra vulgaris."            BIOCHEMICAL JOURNAL,            vol. 295, no. 1, 1993, pages 23-29,            XP000990275            ISSN: 0264-6021            table 1</p>	6,11-13
X	<p>DI MARZO VINCENZO ET AL:            "Polyunsaturated-fatty-acid oxidation in Hydra: Regioselectivity, substrate-dependent enantioselectivity and possible biological role."            BIOCHEMICAL JOURNAL,            vol. 300, no. 2, 1994, pages 501-507,            XP000990271            ISSN: 0264-6021            the whole document</p>	6,11-13
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06539

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEITZ THOMAS ET AL: "Enantiospecific synthesis of bioactive hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) in Hydra magnipapillata." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1213, no. 2, 1994, pages 215-223, XP000990267 ISSN: 0006-3002 the whole document	6,11-13
X	HAWKINS D J ET AL: "RESOLUTION OF ENANTIOMERS OF HYDROXYEICOSATETRAENOATE DERIVATIVES BY CHIRAL PHASE HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 173, no. 2, 1988, pages 456-462, XP000990251 ISSN: 0003-2697 the whole document	6,11-13
X	KUEHN H ET AL: "ANALYSIS OF THE STEREOCHEMISTRY OF LIPOXYGENASE-DERIVED HYDROXYPOLYENOIC FATTY ACIDS BY MEANS OF CHIRAL PHASE HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 160, no. 1, 1987, pages 24-34, XP000990252 ISSN: 0003-2697 table 2	6,11-13
X	PORTER N A ET AL: "THE RESOLUTION OF RACEMIC HYDROPEROXIDES A CHROMATOGRAPHY-BASED SEPARATION OF PERKETALS DERIVED FROM ARACHIDONIC LINOLEIC AND OLEIC ACID HYDROPEROXIDES" CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY, vol. 3, no. 3, 1990, pages 236-243, XP000990214 ISSN: 0893-228X figure 1	13
X	HORNUNG E ET AL: "CONVERSION OF CUCUMBER LINOLEATE 13-LIPOXYGENASE TO A 9-LIPOXYGENATING SPECIES BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 96, no. 7, 1999, pages 4192-4197, XP000915201 ISSN: 0027-8424 the whole document	6-8
A		1-5,9-13

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06539

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 60093 A (HORNUNG ELLEN ;FEUSSNER IVO (DE); INST PFLANZENBIOCHEMIE IPB (DE)) 12 October 2000 (2000-10-12) the whole document ---	6-10
A	FEUSSNER IVO ET AL: "Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids." FETT, vol. 100, no. 4-5, May 1998 (1998-05), pages 146-152, XP002162906 ISSN: 0931-5985 the whole document -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. .onal Application No

PCT/EP 00/06539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0060093 A	12-10-2000	DE 19914464 A AU 3557700 A	05-10-2000 23-10-2000
<hr/>			

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 24 OCT 2001

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



T16

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT1200-031	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06539	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/53		
Anmelder INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE - IPB et al		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  08/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  22.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Friedrich, C  Tel. Nr. +49 89 2399 7721  



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-11                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-11                      eingegangen am                      02/10/2001    mit Schreiben vom    02/10/2001

**Zeichnungen, Blätter:**

1/3-3/3                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	2
	Nein: Ansprüche	1, 3-11
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

Es wird auf die folgende Dokumente verwiesen:

- D1: HORNUNG E ET AL., 1999: Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. PNAS 96:4192-4197.  
D2: FEUSSNER I ET AL., 1998: Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. FETT, 100:146-152.

### **Einleitung**

Die vorliegende Anmeldung bezieht sich auf eine durch Aminosäureaustausch modifizierte pflanzliche Lipoxygenase (LOX) mit erhöhter Spezifität für 11-Arachidonsäure, deren rekombinante Herstellung und transgene Pflanzen für besagte mutierte LOX (Ansprüche 1-8). Außerdem werden die Verwendung der LOX zur Herstellung von 11-Perhydroxy-Arachidonsäure bzw. dem reduzierten 11-Hydroxyderivat und die Arachidonsäurederivate selbst beansprucht (Ansprüche 9-11).

### **Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

#### **1. Neuheit, Art.33(1) und (2), PCT**

Der Gegenstand der Ansprüche 1-11 erscheint gemäß Art.33(2), PCT neu.

#### **2. Erfinderische Tätigkeit, Art.33(1) und (3), PCT**

2.1. Der Gegenstand des vorliegenden Antrags betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Spezifität einer pflanzlichen LOX für 11-Arachidonsäure, gekennzeichnet durch den Austausch mindestens einer Aminosäure an der Position 576 (Anspruch 1). Anspruch 2 betrifft das Einsetzen von Phe an Position 576.

2.2. Da im Stand der Technik bisher keine Verfahren zur Erhöhung der Spezifität einer pflanzlichen LOX für 11-Arachidonsäure beschrieben sind, erscheint das Technische Problem die Bereitstellung eines solchen Verfahrens und der nächste Stand der Technik die Umwandlung von Arachidonsäure durch pflanzliche wildtyp LOX (siehe z.B.

D2, Paragraph 5). Da im gegenwärtigen Antrag nicht gezeigt wird, daß jeder beliebige Aminosäureaustausch an der Position 576 der LOX aus Kartoffelknollen oder an korrespondierender Stelle in LOX von anderen Pflanzenarten die Spezifität für 11-Arachidonsäure erhöht, stellt das im Anspruch 1 charakterisierte Verfahren keine Lösung des angegebenen technischen Problems dar. Folglich erscheint der Anspruch 1 gemäß Art.33 (3) nicht erfinderisch. Es sei dazu z.B. auf die Mutanten H608V und H608M in der Tabelle 2 in D1 hingewiesen, die unterschiedliche Spezifitäten aufweisen.

2.3. Das Einsetzen von Phe an Position 576 gemäß Anspruch 2 in der pflanzlichen LOX Sequenz 73865 stellt laut Beschreibung ein funktionierendes Verfahren zur Erhöhung der Spezifität für 11-Arachidonsäure dar. Der Gegenstand von Anspruch 2 erscheint deshalb gemäß Art.33 (3) erfinderisch, sofern er sich auf LOX aus Kartoffelknollen mit der Sequenz 73865 bezieht (siehe auch Punkt VIII).

2.4. Der abhängige Anspruch 3 scheint keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs 1, auf den er u.a. rückbezogen ist, zu einem auf erfinderischer Tätigkeit gemäß Art.33 (3) beruhenden Gegenstand führen könnte.

2.5. Die Ansprüche 4-10 beziehen sich auf Verfahrensprodukte des Gegenstands der Ansprüche 1-3 und deren Anwendung. Nur wenn der Gegenstand der Ansprüche 1 und 3 als erfinderisch erachtet werden kann, erscheint auch der Gegenstand der Ansprüche 4-10 gemäß Art.33 (2) erfinderisch.

### **3. Industrielle Anwendbarkeit, Art.33 (1) und (4), PCT**

Der Gegenstand der Ansprüche 1-11 erscheint gemäß Art.33 (4), PCT industriell anwendbar.

### **Zu Punkt VIII**

#### **Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

#### **Klarheit der Ansprüche und deren Stützung durch die Beschreibung, Art.6, PCT**

1. Anspruch 1 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, da der Gegenstand des Schutzbegehrens aus folgendem Grund nicht klar ist. Die

Beschreibung weist nur die mutierte Sequenz 73865 (V576F) als eine Lösung für die Aufgabe der Bereitstellung einer LOX mit erhöhter Spezifität für Position 11 von Arachidonsäure auf. Es ist jedoch nicht ersichtlich, ob das Einsetzen beliebiger Aminosäuren an Position 576 oder an korrespondierenden Positionen in anderen pflanzlichen LOX den gleichen Effekt hat. Es wird durch die Anmeldung in der eingereichten Fassung also nicht klar, ob die Lehre auf den in Anspruch 1 beanspruchten Bereich ausgedehnt werden kann (siehe Richtlinien, C-III, 6.3). Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung des o.g. Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale (Ersetzung von Val durch Phe) in den Anspruch 1 aufzunehmen und diesen auf die durch die Beschreibung gestützten Merkmale (Sequenz 73865) zu beschränken.

2. Es gibt für die Vertragsstaaten des PCT keine einheitliche Bestimmung bezüglich der Kennzeichnung von Erzeugnissen durch ein Verfahren. Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß im Rahmen des EPÜ solche Ansprüche nur dann zulässig sind, wenn das Erzeugnis selbst neu und erfindersich ist und das Erzeugnis nicht durch andere technische Merkmale (im vorliegenden Falle z.B. durch Phe an Position 576 der Sequenz 73865) ausreichend definiert werden kann. Für die in Anspruch 4 beanspruchte LOX scheint dies nicht zuzutreffen.

--/--

**Internationale Patentanmeldung PCT/EP00/06539**  
**INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE - IPB et al.**  
**Ref.: PCT1200-03138/GRI**  
**Datum: 2. Oktober 2001**

1. Verfahren zum Erhöhen der Spezifität einer pflanzlichen Lipoxygenase für Position 11 von Arachidonsäure, umfassend den Schritt:
  - Austauschen mindestens einer Aminosäure in einer Wildtyp-Lipoxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch an Position 576 der Lipoxygenase aus Kartoffelknollen oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxygenase aus einer anderen Pflanzenart erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch an Position 576 zum Vorliegen eines Phe-Restes in der Mutante führt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Aminosäureaustausch durch gerichtete Mutagenese herbeigeführt wird.
4. Lipoxygenase, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3.
5. Nukleinsäure, die für eine Lipoxygenase nach Anspruch 4 kodiert.
6. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 5.
7. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 5 und/oder einen Vektor nach Anspruch 6.
8. Pflanze oder Pflanzenteil, umfassend eine Wirtszelle nach Anspruch 7.
9. Verfahren zum Herstellen von 11-Perhydroxy-Arachidonsäure bzw. dem reduzierten 11-Hydroxyderivat, umfassend den Schritt:
  - Umsetzen von Arachidonsäure mit einer Lipoxygenase nach Anspruch 6 und gegebenenfalls Reduzieren der erhaltenen Perhydroxyverbindung zur Hydroxyverbindung.

10. Verwendung einer Lipxygenase nach Anspruch 4 zum Herstellen von 11-Perhydroxy-Arachidonsäure und/oder 11-Hydroxy-Arachidonsäure.
11. Arachidonsäurederivat, enthaltend eine Hydroxygruppe an Position 11.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

8

Applicant's or agent's file reference PCT1200-031	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06539	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53		
Applicant INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE - IPB		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 08 February 2001 (08.02.01)	Date of completion of this report 22 October 2001 (22.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06539

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-11, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-11, filed with the letter of 02 October 2001 (02.10.2001),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/06539

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	2	YES
	Claims	1, 3-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: HORNUNG E ET AL., 1999: Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. PNAS 96:4192-4197,
- D2: FEUSSNER I ET AL., 1998: Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. FETT, 100:146-152.

### Introduction

The present application pertains to a plant lipoxygenase (LOX) modified by amino acid substitution having an increased specificity for 11-arachidonic acid, its recombinant production and transgenic plants for said mutated LOX (Claims 1-8). Furthermore, the use of the LOX itself to produce 11-perhydroxy-arachidonic acid and the reduced 11-hydroxy derivative, as well as the arachidonic acid derivatives, are claimed (Claims 9-11).

#### 1. Novelty PCT Article 33(1) and (2)

The subject matter of Claims 1-11 appears to be novel (PCT Article 33(2)).

#### 2. Inventive step (PCT Article 33(1) and (3))

**2. Inventive step (PCT Article 33(1) and (3))**

2.1 The subject matter of the present request pertains to a method to increase the specificity of a plant LOX for 11-arachidonic acid, characterized by the substitution of at least one amino acid of position 576 (Claim 1). Claim 2 pertains to inserting Phe into position 576.

2.2 Since the prior art has not heretofore described methods for increasing the specificity of a plant LOX for 11-arachidonic acid, the technical problem addressed appears to be providing such a method and the closest prior art to be the transformation of arachidonic acid by plant wild-type LOX (see D2, paragraph 5, for example). Since the present request does not demonstrate that each amino acid substitution whatsoever in position 576 of the LOX from potato tubers or in a corresponding position of the LOX of other plant species increased the specificity for 11-arachidonic acid, the method characterized in Claim 1 does not represent a solution to the specified technical problem. Accordingly, Claim 1 does not appear to be inventive (PCT Article 33(3)). It should also be noted that the mutants H608V and H608M in Table 2 of D1 have different specificities.

2.3 The inserting of Phe into position 576, according to Claim 2, in the plant LOX sequence 73865 represents according to the description a functioning method to increase the specificity for 11-arachidonic acid. Therefore, the subject matter of Claim 2 appears inventive (PCT Article 33(3)) insofar as it pertains to LOX from potato tubers having the sequence 73865 (see also Box VIII).

2.4 Dependent Claim 3 appears to contain no additional

features which, combined with the features of Claim 1, to which it refers, could lead to subject matter involving an inventive step (PCT Article 33(3)).

2.5 Claims 4-10 pertain to method products of the subject matter of Claims 1-3 and their use. Only if the subject matter of Claims 1 and 3 could be regarded as inventive would the subject matter of Claims 4-10 likewise appear inventive (PCT Article 33(3)).

### **3. Industrial applicability**

The subject matter of Claims 1-11 appears to be industrially applicable (PCT Article 33(4)).

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VIII Certain observations on the international application

**Clarity of the claims and their support by the description (PCT Article 6)**

1. Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 6 since the subject matter for which protection is sought is not clear for the following reason. The description has only the mutated sequence 73865 (V576F) as a solution to the problem addressed of providing a LOX having an increased specificity for position 11 of arachidonic acid. However, it is not evident whether the insertion of any amino acid into position 576 or into corresponding positions in other plant LOXs has the same effect. Thus, the submitted version of the application does not make clear whether the teaching can be extended to the scope claimed in Claim 1 (see PCT Guidelines, Chapter III-6.3). To remedy this defect, it appears essential to include the technical features necessary for attaining the above-mentioned result (replacing Val with Phe) in Claim 1 and to limit these to the features supported by the description (sequence 73865).

2. In the PCT Contracting States, there is no uniform prescription concerning to the characterization of products by means of a method. The applicant should note that under the European Patent Convention such claims are only admissible if the product itself is novel and inventive and the product cannot be sufficiently defined by other technical features (in the present case by Phe in position 576 of sequence 73865, for example). This does not appear to apply to the LOX claimed in Claim 4.

**VERTRABER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  <b>PCT1200-031</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen  <b>PCT/EP 00/ 06539</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  <b>10/07/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  <b>08/07/1999</b>
Anmelder  <b>INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE - IPB</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2 ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3 ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12P7/64 C07C69/732 C07C59/42 C07C409/04		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C12P C07C		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MULLIEZ E ET AL: "5 LIPOXYGENASE FROM POTATO TUBERS IMPROVED PURIFICATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 916, Nr. 1, 1987, Seiten 13-23, XP000990244 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument --- -/--	6,11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *G* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
15. März 2001		29/03/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Maddox, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>REDDY G RAMAKRISHNA ET AL:            "11-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid is the major dioxygenation production of lipoxygenase isolated from hairy root cultures of Solanum tuberosum."            BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,            Bd. 189, Nr. 3, 1992, Seiten 1349-1352,            XP002162902            ISSN: 0006-291X            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	6,11-13
X	<p>REDDY C C ET AL: "MECHANISM OF FORMATION OF LEUKOTRIENES AND LIPOXINS FROM ARACHIDONIC ACID CATALYZED BY HOMOGENOUS LIPOXYGENASE FROM POTATO TUBERS" ADVANCES IN PROSTAGLANDIN THROMBOXANE AND LEUKOTRIENE RESEARCH,            1989, Seiten 132-136, XP000990260            ISSN: 0732-8141            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	6,11-13
X	<p>VAN ZADELHOFF GUUS ET AL: "With anandamide as substrate plant 5-lipoxygenases behave like 11-lipoxygenases."            BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,            Bd. 248, Nr. 1, 9. Juli 1998 (1998-07-09),            Seiten 33-38, XP002162903            ISSN: 0006-291X            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	6,11-13
X	<p>DI MARZO VINCENZO ET AL: "Biosynthesis, structure and biological activity of hydroxyeicosatetraenoic acids in Hydra vulgaris."            BIOCHEMICAL JOURNAL,            Bd. 295, Nr. 1, 1993, Seiten 23-29,            XP000990275            ISSN: 0264-6021            Tabelle 1</p> <p>---</p>	6,11-13
X	<p>DI MARZO VINCENZO ET AL:            "Polyunsaturated-fatty-acid oxidation in Hydra: Regioselectivity, substrate-dependent enantioselectivity and possible biological role."            BIOCHEMICAL JOURNAL,            Bd. 300, Nr. 2, 1994, Seiten 501-507,            XP000990271            ISSN: 0264-6021            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	6,11-13

-/--



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEITZ THOMAS ET AL: "Enantiospecific synthesis of bioactive hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) in Hydra magnipapillata." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1213, Nr. 2, 1994, Seiten 215-223, XP000990267 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument	6,11-13
X	--- HAWKINS D J ET AL: "RESOLUTION OF ENANTIOMERS OF HYDROXYEICOSATETRAENOATE DERIVATIVES BY CHIRAL PHASE HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 173, Nr. 2, 1988, Seiten 456-462, XP000990251 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument	6,11-13
X	--- KUEHN H ET AL: "ANALYSIS OF THE STEREOCHEMISTRY OF LIPOXYGENASE-DERIVED HYDROXYPOLYENOIC FATTY ACIDS BY MEANS OF CHIRAL PHASE HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 160, Nr. 1, 1987, Seiten 24-34, XP000990252 ISSN: 0003-2697 Tabelle 2	6,11-13
X	--- PORTER N A ET AL: "THE RESOLUTION OF RACEMIC HYDROPEROXIDES A CHROMATOGRAPHY-BASED SEPARATION OF PERKETALS DERIVED FROM ARACHIDONIC LINOLEIC AND OLEIC ACID HYDROPEROXIDES" CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY, Bd. 3, Nr. 3, 1990, Seiten 236-243, XP000990214 ISSN: 0893-228X Abbildung 1	13
X	--- HORNING E ET AL: "CONVERSION OF CUCUMBER LINOLEATE 13-LIPOXYGENASE TO A 9-LIPOXYGENATING SPECIES BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 96, Nr. 7, 1999, Seiten 4192-4197, XP000915201 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	6-8
A	--- -/--	1-5,9-13

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	WO 00 60093 A (HORNING ELLEN ;FEUSSNER IVO (DE); INST PFLANZENBIOCHEMIE IPB (DE)) 12. Oktober 2000 (2000-10-12) das ganze Dokument ---	6-10
A	FEUSSNER IVO ET AL: "Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids." FETT, Bd. 100, Nr. 4-5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 146-152, XP002162906 ISSN: 0931-5985 das ganze Dokument -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0060093 A	12-10-2000	DE 19914464 A AU 3557700 A	05-10-2000 23-10-2000
<hr/>			

Translation  
10/035 cl 4  
5069

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H 3674 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05997	International filing date (day/month/year) 28 June 2000 (28.06.00)	Priority date (day/month/year) 09 July 1999 (09.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C09J 9/00, C08J 3/12, B29B 9/06		
Applicant HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 January 2001 (22.01.01)	Date of completion of this report 30 October 20001 (30.10.20001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05997

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-17 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_ 1-15 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/05997

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	10 - 14	YES
	Claims	1 - 9, 15	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	10 - 14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

**I** This report makes reference to the following document (D) :

D1: WO-A-99/18147

**II** The subjects of Claims 1 - 9 and 15 are not novel over the citation D1. That document discloses hot-melt adhesives ("HMPSA") in pellet form with a substantially complete outer layer consisting of a "pelletizing aid". As a result, the pellets are still free-flowing at a temperature of 38 °C, preferably 49 °C, after 2 weeks, which implies that the pelletizing aid is not tacky up to at least 45 °C. The pellets have a diameter of 3 to 10 mm. The pelletizing aid can be a component of the HMPSA, for example a tackifier with a melting point less than 160 °C, preferably less than 120 °C, but can also be a substance compatible with the HMPSA which does not adversely affect the properties of the HMPSA, for example a thermoplastic composition. Suitable polymers include polyurethanes, acrylates, vinyl resins and natural rubber. The pelletizing aid content can be 1 to 50 wt.%, preferably 3 to 10 wt.%. The pellets can be produced by a method according to the present Claim 9. In particular, D1 discloses underwater pelletization in a cooled water or liquid bath and spraying of the pellets with molten

.../...

(Continuation of V.2)

pelletizing aid or pelletizing aid dispersed in water. Storage at room temperature is implicitly disclosed, because this is identical with the conventional conservation of the coated pellets. See D1, Claims 1, 2, 6, 7, 9, 10, 15 and 20, page 7, lines 12 - 25, page 9, lines 14 - 16, page 10, lines 5 - 11, page 11, line 4 to page 12, line 4, page 13, lines 4 - 31, page 16, line 13 to page 17, line 16. D1 is therefore prejudicial to novelty for the subjects of Claims 1 - 9 and 15.

**III** The subjects of Claims 10 - 14 do not involve an inventive step in relation to D1 in combination with the specialized knowledge of a person skilled in the art. A person skilled in the art will naturally dry the freshly pelletized particles before they are coated, because otherwise the adhering water or coolant would adversely affect the contact with the sprayed-on pelletizing aid. He will also carry out the coating before the cooled particles become tacky again. Claims 12 and 13 describe a method in standard commercial machines for coating particles; see also the present description.

\*\*\*\*\*

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/04323 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/53,  
9/02, C12P 7/64, C07C 69/732, 59/42, 409/04

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR  
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538  
München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06539

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. Juli 2000 (10.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 31 819.0 8. Juli 1999 (08.07.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US*): INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE - IPB  
[DE/DE]; Weinberg 3, 06120 Halle (DE).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FEUSSNER, Ivo  
[DE/DE]; Schleiermacherstrasse 9, 06114 Halle (DE).  
HORNUNG, Ellen [DE/DE]; Serverinweg 3, 06484  
Quedlinburg (DE). ROSAHL, Sabine [DE/DE]; Goethes-  
trasse 11, 06114 Halle (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: 11-ARACHIDONATE-LIPOXYGENASE MUTANTS

(54) Bezeichnung: 11-ARACHIDONAT-LIPOXYGENASE-MUTANTE

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a plant lipoxigenase with modified positional specificity toward arachidonic acid and to its utilization for hydroperoxydation of arachidonic acid. The inventive LOX makes it possible to produce for the first time (11S,14Z,12E,8Z,5Z)-11-hydroperoxy-14,12,8,5- eicosatetraenic acids at a large scale. To this end, arachidonic acid is incubated as substrate with the inventive LOX under appropriate conditions. Hydroperoxydation of the arachidonic acid is then effected, preferably in position 11, with secondary products which are hydroperoxylated in position 8 or position 5 or position 11 and 8 and 5.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen einer pflanzlichen Lipoxxygenase mit veränderter Positionsspezifität gegenüber Arachidonsäure und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Arachidonsäure. Insbesondere erlaubt die erfindungsgemässe LOX erstmalig das Herstellen von (11S,14Z,12E,8Z,5Z)-11-Hydroperoxy-14,12,8,5-eico-satetraensäure in grossem Massstab. Hierzu wird Arachidonsäure als Substrat mit den erfindungsgemässen LOX unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Die Hydroperoxylierung der Arachidonsäure erfolgt dann, vorzugsweise an Position 11 mit Nebenprodukten, die an Position 8 bzw. Position 5 bzw. Position 11 und 8 und 5 hydroperoxyliert sind.

WO 01/04323 A2



## 11-ARACHIDONAT-LIPOXYGENASE-MUTANTE

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer pflanzlichen Lipoxygenase mit veränderter Positionsspezifität sowie die durch das Verfahren erhaltene Lipoxygenase und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Arachidonsäure an Kohlenstoffatom 11.

Lipoxygenasen (LOXs, Linolensäure: Sauerstoff-Oxidoreduktase; EC.1.13.11.12; LOXs) sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet (Siedow, J.N. (1991) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145-188; Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131). Diese Enzyme stellen eine Familie aus eisenhaltigen Dioxygenasen dar, die eine bereichs- (oder positions-) und stereoselektive Oxygenierung von Polyenfettsäuren zu Hydroperoxyderivaten katalysieren (Rosahl, S. (1996) *Z. Naturforsch.* 51c, 123-138). In Säugern werden LOXs nach ihrer Spezifität für bestimmte Positionen bei der Arachidonsäureoxygenierung klassifiziert (Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131; Schewe, T., Rapaport, S.M. & Kühn, H. (1986) *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* 58, 191-272). So wurden hier bisher 15-, 12-, 8- und 5-LOXs isoliert und charakterisiert. LOXs, die die Insertion von Sauerstoff an den Positionen 9- bzw. 11 am Kohlenstoffgerüst von Arachidonsäure inserieren, sind noch nicht bekannt (Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131). Da Arachidonsäure in höheren Pflanzen nicht vorkommt oder nur in geringen Mengen als Bestandteil von Speicherlipiden, werden LOXs aus Pflanzen als 9- und 13-LOXs klassifiziert. Diese Nomenklatur leitet sich von der Position ab, an der in Linolsäure (LA) die Oxygenierung erfolgt (Gardner, H.W. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 221-239). In jüngster Zeit ist eine umfangreichere Klassifizierung pflanzlicher LOXs auf der Grundlage eines Vergleichs der Primärstrukturen vorgeschlagen worden (Shibata, D. & Axelrod, B. (1995) *J. Lipid Mediators Cell Signal.* 12, 213-228). Die Spezifität einer LOX für eine bestimmte Position ist das Ergebnis zweier katalytischer Teilreaktionen:

(i)

der bereichs- und stereospezifischen Entfernung von Wasserstoff, wobei bei Fettsäuren, die mehrere Doppelbindungen enthalten (wie Linolensäure, Arachidonsäure oder Eikosapentaensäure), die Wasserstoffentfernung an verschiedenen Positionen erfolgen kann;

(ii)

der bereichs- und stereospezifischen Sauerstoff-Insertion (wobei der Sauerstoff an verschiedenen Positionen (der +2 oder -2 Position) eingefügt werden kann (Vergleich Figur 1). Somit kann eine Fettsäure mit 3 doppelallylischen Methylenen, wie Arachidonsäure, von einer LOX zu 6 regioisomeren Hydroperoxyderivaten (HPETEs) oxyniert werden, nämlich zu 15- und 11-HPETE (diese stammen aus der Entfernung von Wasserstoff an Position C-13), 12- und 8-HPETE (diese stammen aus der Wasserstoffentfernung an Position C-10) und 9- und 5-HPETE (diese stammen aus der Wasserstoffentfernung an Position C-7). Experimente mit 12- und 15-LOX aus Säugern zeigten, daß die Position der Wasserstoffentfernung verändert werden kann, wenn kritische Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese verändert werden (Borngräber, S., Kuban, R. J., Anton, M. & Kühn, H. (1996) J. Mol. Biol. 264, 1145-1153; Sloane, D.L., Leung, R., Craik, C. S. & Sigal, E (1991) Nature 354, 149-152). Versuche zum Ändern der LOX-Reaktivität von einer +2 nach -2-Umlagerung oder umgekehrt (z. B. Umwandeln einer Linoleat-13-LOX zu einer 9-LOXs) mit Hilfe gerichteter Mutagenese waren kürzlich erfolgreich (Hornung, E., Walther, M., Kühn, H. & Feussner, I. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4192-4197).

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit der eine LOX mit gewünschter C-11 Positionsspezifität bei Arachidonsäure bereitgestellt werden könnte.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, bei dem mindestens eine Aminosäure in einer Wildtyp-LOX, vorzugsweise aus der Kartoffelknolle ausgetauscht wird.

Figur 1 zeigt die Spezifität einer LOX-Reaktion mit Substraten, die zwei allylische Methylenen enthalten.

Figur 2 zeigt die HPLC-Analyse von Hydroxyfettsäuren, die mit Hilfe der Wildtyp-LOX aus Kartoffelknollen und der V576F-Mutante aus Arachidonsäure nach Reduktion der Hydroperoxyfettsäuren mit Natriumborhydrid erhalten werden.

Figur 3 zeigt die Sequenz der Wildtyp-LOX aus Kartoffelknollen. Die mutagenisierte Aminosäureposition ist unterstrichen. Die verwendeten Primer 1 und 2 sind ebenfalls gezeigt.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Austausch der Aminosäuren im Bereich der Aminosäureposition 570 bis 581 der LOX aus Kartoffelknollen. Die oben angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Sequenz unter der Zugangsnummer S73865 in der EMBL-Datenbank bzw. der Sequenz gemäß Figur 3. Die zu den Aminosäurepositionen 593 bis 602 der Lipoxxygenase aus *Cucumis sativus* korrespondierenden Positionen in LOXs aus anderen Pflanzenarten können durch Sequenzvergleiche zwischen der Sequenz X92890 und den weiteren Proteinsequenzen wie aus Sojabohnen, Kartoffel, Arabidopsis, Tabak oder Gerste leicht ermittelt werden. Die folgende Tabelle 1 zeigt das Ergebnis eines Aminosäurevergleichs zwischen dem aus Gurken stammenden Enzym und den korrespondierenden Positionen in den Enzymen aus anderen Pflanzen. Die erste Gruppe (15-LOX) zeigt einen Vergleich zwischen LOXs, die an Position 15 eine Hydroperoxy-Gruppe in ein Molekül Arachidonsäure einführen, während die zweite Gruppe (5-LOX) einen Vergleich zwischen Sequenzen zeigt, die an Position 5 einen Hydroperoxy-Rest einführen.

**Tabelle 1**

Vergleich der Aminosäurereste, die an der Spezifität einer pflanzlichen LOX für eine bestimmte Position (15 bzw. 5) beteiligt sind.

ENZYME Rest	Zugangs-Nr.	Position d. AS-Restes	AS
<b>15-LOX</b>			
Gurke-Lipid-Körper LOX	X92890	596/597	Thr/His
LOX-1 aus Sojabohnensamen	P08170	556/557	Thr/Phe
LOX-H1 aus Kartoffeln	X96405	614/615	Ser/Phe
LOX-2 aus <i>Arabidopsis</i>	P38418	611/612	Cys/Phe
<b>5-LOX</b>			
LOX aus Kartoffel	S73865	575/576	Thr/Val
Elicitor-induzierte LOX aus <i>Tabak</i>	X84040	580/581	Thr/Val
LOX-A aus Gerstenkorn	L35931	574/575	Thr/Val

Das Sequenzmotiv bei Position 570 bis 581 lautet GVLESTVFPSK (Sequenz gemäß S73865).

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Austausch an Position 576 der Sequenz S73865. An Position 576 befindet sich im Wildtyp ein Val-Rest. Hier wird der Rest an Position 576 durch einen Phe-Rest ersetzt. Dabei führt der Austausch in dem Bereich der Aminosäureposition 570 bis 581 dazu, daß die 5-LOX aus der Kartoffelknolle in eine Arachidonsäure 11-LOX umgewandelt wird. Im folgenden wird diese Mutante auch als V576F bezeichnet. Die Wildtypsequenz ist als Figur 3 gezeigt. Die Position 576 ist markiert.

Vorzugsweise erfolgt der Austausch der Aminosäuren in dem Wildtyp mit Hilfe der gerichteten Mutagenese, wie sie im Stand der Technik hinlänglich bekannt ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin LOX-Mutanten, die nach den oben beschriebenen Verfahren erhältlich sind. Die erfindungsgemäßen LOXs lassen sich mit Hilfe der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, wie der gerichteten Mutagenese, und der anschließenden Proteinexpression herstellen. Dabei gelten als erfindungsgemäß insbesondere die Mutanten, die nach Inkubation mit Arachidonsäure zu mindestens 40 %, vorzugsweise 50 % das an Position 11 perhydroxylierte Derivat liefern.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen LOXs kodieren. Ausgehend von den im Stand der Technik verfügbaren Wildtypsequenzen, lassen sich die erfindungsgemäßen Sequenzen durch gerichtete Mutagenese herstellen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, in die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zum Zwecke der Klonierung und Expression eingebracht werden. Entsprechende Klonierungs- und Expressionsvektoren sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt (vgl. Maniatis et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

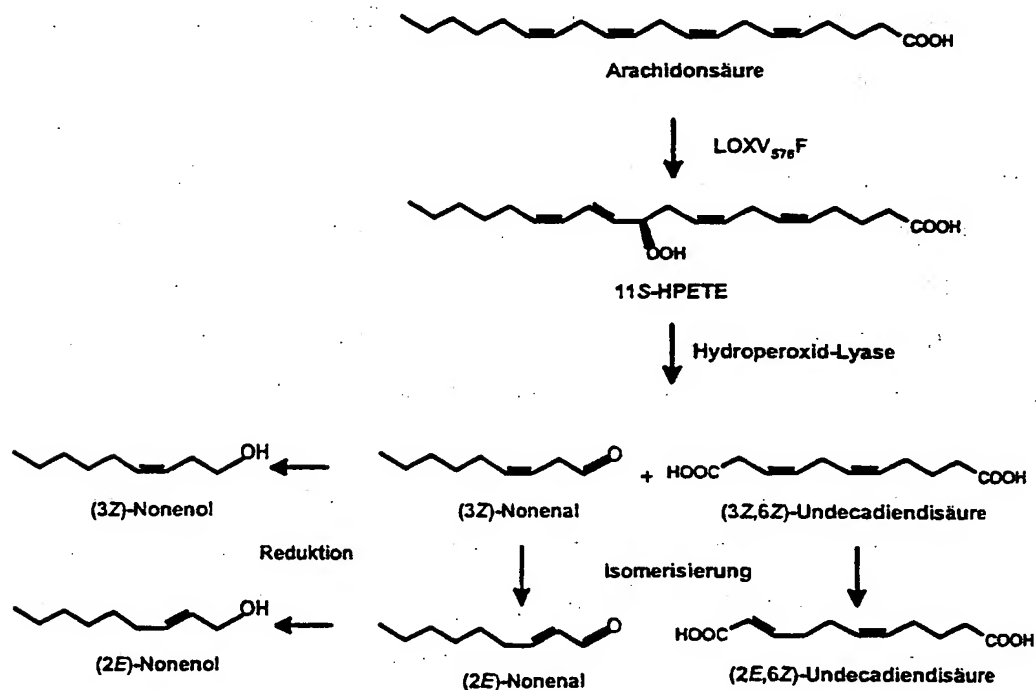
Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Zelle, in die die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder der erfindungsgemäße Vektor eingebracht werden. Nach Einbringen der Nukleinsäure bzw. des Vektors ist die Zelle dann in der Lage, eine LOX erstmalig oder in verstärktem Maße zu exprimieren. Auf diese Weise kann das Fettsäuremuster einer Zelle gezielt verändert werden mit dem Ergebnis, daß der Phänotyp der Zelle in verschiedener Hinsicht verändert werden kann. Hierzu zählt u. a. eine andere Zusammensetzung der Zellmembran.

Schließlich können durch *in vitro*-Kultivierungsverfahren aus den o. g. Zellen neue Pflanzen bzw. Pflanzenteile regeneriert werden. Zum Herstellen solcher transgener Pflanzen kann beispielsweise das bekannte Transformationssystem auf der Basis von *Agrobakterien* und Ti-Plasmid-Derivaten eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen LOXs erlauben erstmalig das Herstellen neuer Arachidonsäure-Derivate in großem Maßstab. Hierzu wird Arachidonsäure als Substrat mit den

erfindungsgemäßen LOX unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Es erfolgt dann eine Hydroperoxylierung der Arachidonsäure vorzugsweise an Position 11.

Besonders bevorzugt ist ein Arachidonsäure-Derivat, das eine Hydroperoxygruppe an Position 11 enthält. Das Derivat kann dann einfach in das Hydroxyderivat überführt werden. Das so zugängliche 11S-HPETE kann zur Herstellung der unten gezeigten Alkohole, Aldehyde und Dikarbonsäuren verwendet werden. Das Enzym Hydroperoxid-Lyase ist z.B. in Extrakten von Gurkenkeimlingen enthalten. 2E- und 3Z-Nonenal und deren Alkohole sind wichtige Aromastoffe von Lebensmitteln (z.B. Gurken).



Ein solches Arachidonsäurederivat war bisher nicht zugänglich, da es an einer LOX mit geeigneter Positionsspezifität fehlte.

Die weiteren Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

## 1. Herstellen der Mutante V576F

### Materialien:

Die verwendeten Chemikalien wurden aus den folgenden Quellen bezogen: die Standards für chirale und racemische Hydroxyfettsäuren wurden von Chayman Chem (Ann Arbor, Mi, USA) bezogen. Methanol, Hexan, 2-Propanol (allesamt HPLC-Grad) wurden von Baker (Griesheim, Deutschland) bezogen. Restriktionsenzyme wurden von New England BioLabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen.

### Gerichtete Mutagenese und Proteinexpression:

Für die bakterielle Expression der Wildtyp-LOX und der LOX-Mutante und für die gerichtete Mutagenese wurde das Plasmid pet3b (Novagen, Deutschland) verwendet, das die cDNA der LOX aus Kartoffelknollen als Insert enthielt (pET-LOX1; vgl. Geerts, A, Feltkamp, D, Rosahl, S (1994) Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *solanum tuberosum* L. Plant Physiol. 105: 269-277). Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange-Mutagenese-Kits von Stratagene (Heidelberg, Deutschland), durchgeführt. Oligonukleotide mit den geeigneten Basenaustauschen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Zur Analyse der Mutation wurde ein weiterer konservativer Basenaustausch eingeführt, um eine neue Restriktionsspaltstelle zu erzeugen. Weiterhin wurde die Mutation sequenziert, und mindestens fünf verschiedene Bakterienklone wurden exprimiert und für die Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften eingesetzt. Die Expression von pET-LOX1- und seiner Mutante wurde gemäß Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436, durchgeführt. Zellen aus 1-Liter-Kulturen wurden in 5 bis 7 ml Lysispuffer resuspendiert und mit Hilfe einer Ultraschallspitze mit Pulsen für jeweils 30 Sekunden aufgebrochen, und die Zelltrümmer wurden pelletiert.

### Aktivitätsassay und Probenaufbereitung:

Für die Produktanalyse wurden 0,9 ml der Zell-Lysate mit 0,9 mM Arachidonsäure (Endkonzentration) in 100 mM Tris-Puffer pH 7,5 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch den Zusatz von Natriumborhydrid, um die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen umzuwandeln. Die Proben wurden auf pH 3 angesäuert, und die Lipide wurden extrahiert (vgl. Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917). Die untere Chloroformphase wurde wiedergewonnen und das Lösungsmittel abgedampft. Das verbleibende Lipid wurde mit 0,1 ml Methanol gelöst und Aliquots wurden der HPLC-Analyse unterzogen.

### Analyse:

Die HPLC-Analyse wurde mit einem Hewlett Packard 1100 HPLC System, gekoppelt an einen Diodendetektor, durchgeführt. Die RP-HPLC der freien Fettsäurederivate wurde auf einer Nucleosil C-18 Säule (Macherey-Nagel, 250 x 4 mm, 5µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus Methanol/Wasser/Essigsäure (85/15/0,1; v/v/v) und einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Absorption bei 234 nm (Absorption des konjugierten Diensystems der Hydroxyfettsäuren) und bei 210 nm (Polyenfettsäuren) wurden entsprechend aufgezeichnet. Die Direktphasen-HPLC (SP-HPLC) von Hydroxyfettsäurenisomeren wurde auf einer Zorbax SIL Säule (HP, Waldbronn, Deutschland; 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus n-Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100/2/0,1, v/v/v) in einer Flußrate von 1ml/min durchgeführt. Die Enantiomer-Zusammensetzung der Hydroxyfettsäuren wurde analysiert mit Hilfe von Chiral-Phasen-HPLC auf einer Chiralcel-OD-Säule (Daicel Chem. Industrie, vertrieben von Baker Chem., Deventer, Niederlande; 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100/5/0,1, v/v/v) in einer Flußrate von 1 ml/min. (vgl. Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kühn, H. & Wasternack, C. (1997) J. Biol. Chem. 272, 21635-21641).



## 2. Herstellen der LOX-V576F-Mutant :

Die für die Herstellung dieser Mutante verwendeten Reagenzien und Verfahren waren im wesentlichen wie bereits oben beschrieben. Im folgenden werden einige Abwandlungen der o. g. Verfahren, die speziell an die Herstellung der V576F Mutante angepaßt waren, erläutert.

### Gerichtete Mutagenese und Proteinexpression:

Die Ausgangs-cDNA und der Mutagenesekit waren wie oben beschrieben. Zur Analyse der Mutation wurden weitere konservative Basenaustausche durchgeführt, um eine neue Restriktionsspaltstelle für BstBI zu erzeugen. Für die Herstellung der Mutation V576F wurden die folgenden Primer verwendet: GCT GGT GGG GTT CTT GAG AGT ACA TTC TTT CCT TCG AAA TTT GCC ATG GAA ATG TCA GCT G (kodierender Strang) und CAG CGT ACA TTT CCA TGG CAA ATT TCG AAG GAA AGA ATG TAC TCT CAA GAA CCC CAC CAG C (komplementärer Strang). Weiterhin wurde die Mutante sequenziert und 5 verschiedene Bakterienkolonien wurden expremiert und für die enzymatischen Untersuchungen verwendet. Die Expression von pET-LOX1 wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Auch die weitere Aufbereitung erfolgte wie bereits oben angegeben. Auch die Analyse des erzeugten Fettsäurederivats (das eine Hydroperoxygruppe in 11 Position enthält), erfolgte wie oben angegeben. Das Ergebnis der SP-HPLC Analyse der Umsetzung von Arachidonsäure mit V576F ist in Figur 2 gezeigt. Die folgende Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der Spezifität des Wildtyps (wtLOX) mit der Mutante (LOXV<sub>576F</sub>).

**Tabelle 2**

Vergleich der Produktspezifität von wtLOX und LOXV<sub>576</sub>F mit Arachidonsäure

Enzym	(15S,13E,11Z,8Z,5Z)- 20:4	(12S, 14Z, 10E,8Z,5Z) -20:4	(11S,14Z,12E,8Z,5Z)- 20:4	(9S,14Z,11Z,7E,5Z) -20:4	(8S,14Z,11Z,9E,5Z) -20:4	(5S, 14Z, 11Z,8Z,6E)- 20:4
wtLOX	5 %	6 %	23 %	3 %	21 %	42 %
LOXV <sub>576</sub> F	9 %	4 %	50 %	3 %	23 %	11 %

**3. Figurenbeschreibung**

Figur 1 zeigt, daß die Positionsspezifität der LOX-Reaktion von dem Ort der Wasserstoffabspaltung und von der Orientierung des Radikals abhängt. Die [+2]-Radikalanordnung zeigt, daß der Sauerstoff an dem zweiten Kohlenstoffatom in Richtung des Methylterminus des Substrats, gezählt von der Stelle der Wasserstoffentfernung, eingeführt wird. [-2] zeigt die inverse Orientierung der Radikalanordnung.

Figur 2 zeigt die HPLC-Analyse von Fettsäuren mit der Mutante V576F. Gleiche Mengen an LOX-Protein wurden mit 0,9 mM Arachidonsäure bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Reduktion der Lipide mit Natriumborhydrid wurde die Reaktionsmischung auf pH 3 mit Essigsäure angesäuert, und die Lipide wurden extrahiert. Die oxygenierten Fettsäurederivate wurden mittels RP-HPLC isoliert, und die einzelnen Positionsisomere wurden mit Hilfe der SP-HPLC analysiert. Die Verhältnisse von S und R wurden mit Hilfe der CP-HPLC analysiert (eingesetzte Abbildungen).

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenz der Wildtyp-Lipoxygenase aus Kartoffelknollen. Das mutierte Val576 ist unterstrichen.

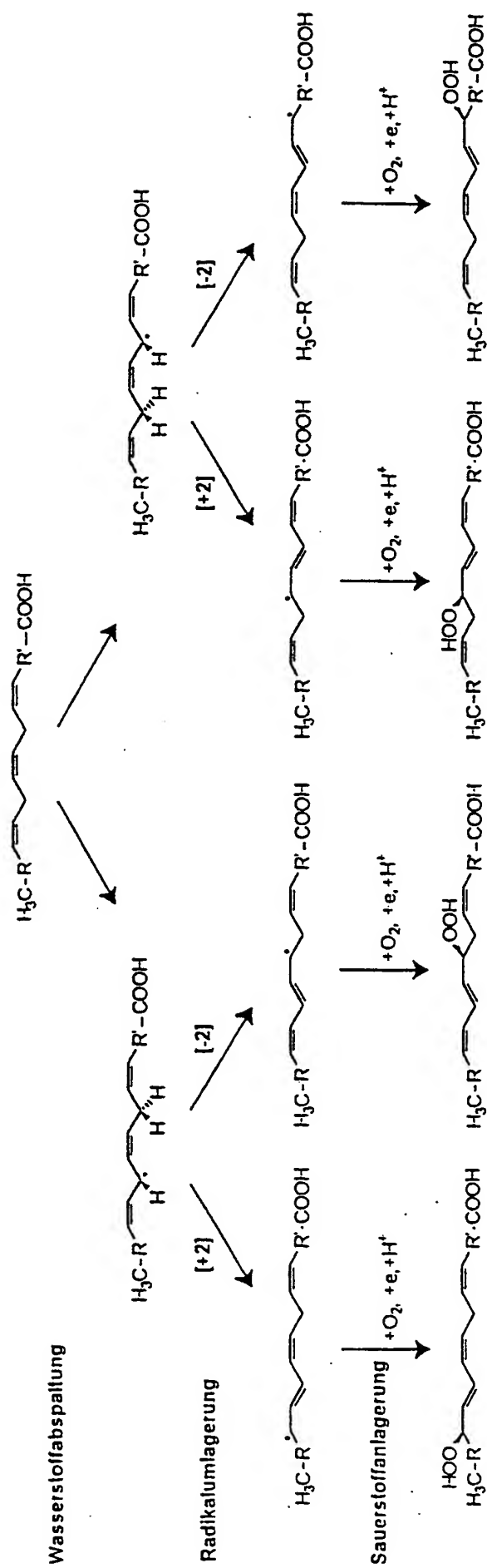
**Verwendete Abkürzungen sind:**

CP-HPLC	für	chirale Phase HPLC;
RP-HPLC	für	Umkehrphasen HPLC;
SP-HPLC	für	Direktphasen HPLC;
HPETE	für	Hydroperoxyarachidonsäure;
LOX	für	Lipoxygenase;
HETE	für	Hydroxyarachidonsäure

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zum Erhöhen der Spezifität einer pflanzlichen Lipoxxygenase für Position 11 von Arachidonsäure, umfassend den Schritt
  - Austauschen mindestens einer Aminosäure in einer Wildtyp-Lipoxxygenase.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der bzw. die Aminosäureaustausch(e) im Bereich der Aminosäureposition 570 bis 581 der Lipoxxygenase aus Kartoffelknollen oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxxygenase aus einer anderen Pflanzenart erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Austausch an Position 576 der Lipoxxygenase aus Kartoffelknollen oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxxygenase aus einer anderen Pflanze erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Austausch an Position 576 zum Vorliegen eines Phe-Restes in der Mutante führt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Aminosäureaustausch durch gerichtete Mutagenese herbeigeführt wird.
6. Lipoxxygenase, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5.
7. Nukleinsäure, die für eine Lipoxxygenase nach Anspruch 6 kodiert.
8. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 7.
9. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 und/oder einen Vektor nach Anspruch 8.
10. Pflanze oder Pflanzenteil, umfassend eine Wirtszelle nach Anspruch 9.

11. Verfahren zum Herstellen von 11-Perhydroxy-Arachidonsäure bzw. dem reduzierten 11-Hydroxyderivat, umfassend den Schritt
  - Umsetzen von Arachidonsäure mit einer Lipxygenase nach Anspruch 6 und gegebenenfalls Reduzieren der erhaltenen Perhydroxyverbindung zur Hydroxyverbindung.
12. Verwendung einer Lipxygenase nach Anspruch 6 zum Herstellen von 11-Perhydroxy-Arachidonsäure und/oder 11-Hydroxy-Arachidonsäure.
13. Arachidonsäurederivat, enthaltend eine Hydroperoxygruppe oder eine Hydroxygruppe an Position 11.



**Fig. 1**

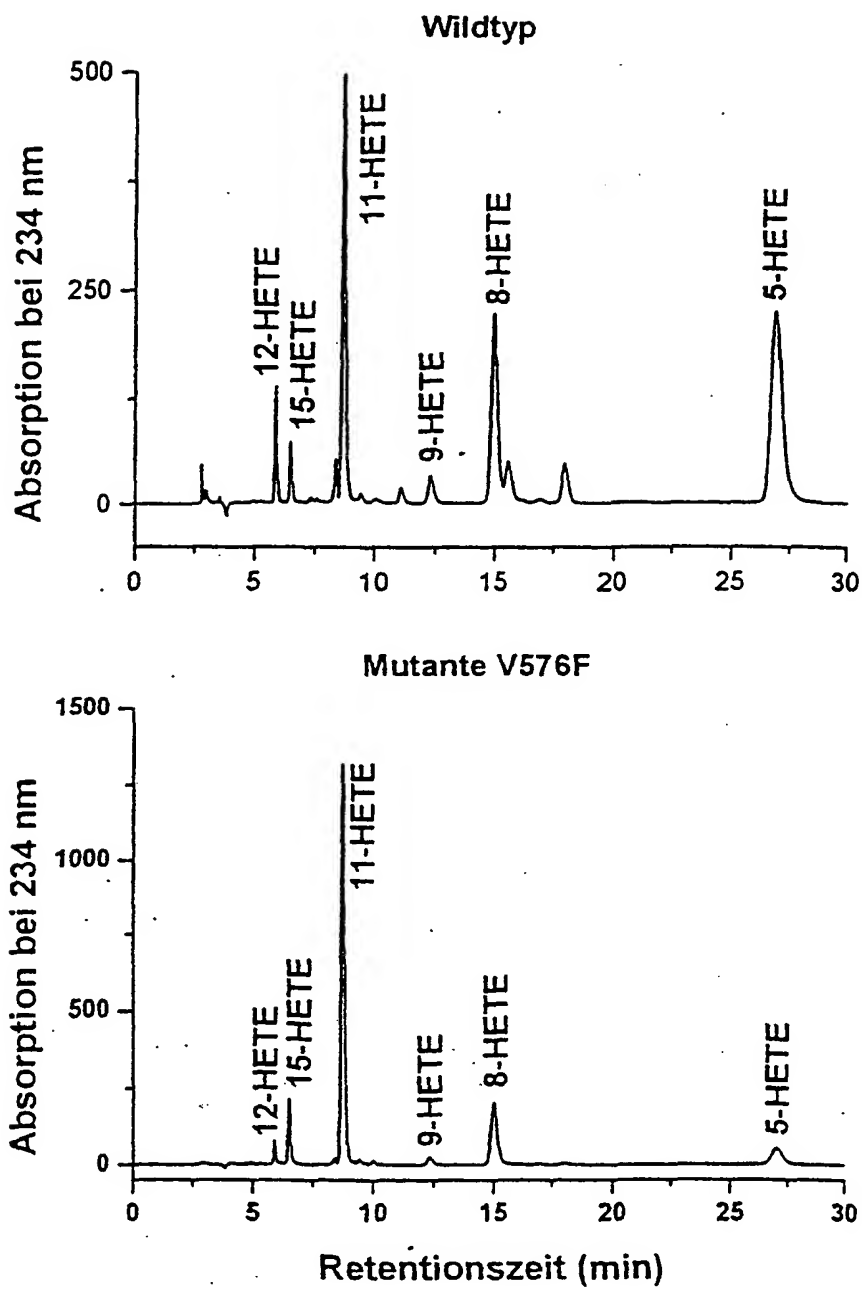


Fig. 2

1 QIVGGLIGGH HDSKKVKGT VMMKKNALDF TDLAGSLTDK IFEALGQKVS FQLISSVQS  
D  
61 PANGLOQKHS NPAYLENFLF TLTPLAAGET AFGVTFDWNE EFGVPGAFII KNTHINEFF  
L  
121 KSLTLEDVPN HGKVHFVCNS WVYPSFRYKS DRIFFANQPY LPSETPELLR KYRENELLT  
L  
181 RGDGTGKREA WDRIYDYDVY NDLGNPDQGE QNVRTTLGGS ADYPYPRRGR TGRPPTRTD  
P  
241 KSESRIPLIL SLDIYVPRDE RFGHLKMSDF LTYALKSIVQ FILPELHALF DGTPNEFDS  
F  
301 EDVLRLYEGG IKLPQGPLFK ALTAAIPLEM MKELLRTDGE GILRFPTPLV IKDSKTAWR  
T  
361 DEEFAREMLA GVNPIIISRL QEFPPKSKLD PEAYGNQNST ITAEHIEDKL DGLTVDEAM  
N  
421 NNKLFILNHH DVLIPYLRRI NTTTTKTYAS RTLLFLQDNG SLKPLAIELS LPHPDGDQF  
G  
481 VISKVYTPSD QGVESSIWQL AKAYVAVNDS GVHQLISHWL NTHAVIEPFV IATNRQLSV  
L  
541 HPIHKLLYPH FRDTMNINAM ARQILINAGG VLESTVFPSK FAMEMSAVVY KDWVFPDQA  
L  
601 PADLVKRGVA VEDSSSPHGV RLLIEDYPYA VDGLEIWSAI KSWVTDYCSF YYGSDEEIL  
K  
661 DNELQAWWKE LREVGHGDKK NEPWPEMET PQELIDSCTT IIWIASALHA AVNFGQYPY  
A  
721 GYLPNRPTVS RRFMPEPGTP EYEELKKNPD KAFLKTITAO LQTLGVSLI EILSRHTTD  
E  
781 IYLGQRESPE WTKDKEPLAA FDKFGKKLTD IEKQIIQRNG DNILTNRSGP VNAPYTLLF  
P  
841 TSEGGLTGKG IPNSVSI

Primer1: GCT GGT GGG GTT CTT GAG AGT ACA TTC TTT CCT TCG AAA TTT GCC  
ATG GAA ATG TCA GCT G

Primer2: CAG CGT ACA TTT CCA TGG CAA ATT TCG AAG GAA AGA ATG TAC TCT  
CAA GAA CCC CAC CAG C

Fig. 3



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Institut für Pflanzenbiochemie

<120> 11-Arachidonat-Lipoxygenase-Mutante

<130> P30743

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 61

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:primer

<400> 1

gctggtgggg ttcttgagag tacattcttt ccttcgaaat ttgccatgga aatgtcagct 60  
g 61

<210> 2

<211> 61

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:primer

<400> 2

cagcgtacat ttccatggca aatttcgaag gaaagaatgt actctcaaga accccaccag 60  
c 61